

ЛЕКЦИИ

А.К. Жерносек

ХАРАКТЕРИСТИКА, СВОЙСТВА И СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ-МАКРОЛИДОВ

Витебский государственный медицинский университет

В лекции дана общая характеристика антибиотиков-макролидов, описаны химическая структура и свойства эритромицина и его полусинтетических производных, а также приведены современные данные по их фармакопейному анализу.

1. Введение

Антибиотики-макролиды используются в медицине уже более 50 лет. В последние годы, в связи с получением новых полусинтетических макролидов, интерес к антибиотикам данной группы значительно увеличился. Так, объем аптечных продаж азитромицина в Российской Федерации за I-III кварталы 2003 года составил 8,89 миллиона долларов (большой объем продаж из антибиотиков имеет только амоксициллин).

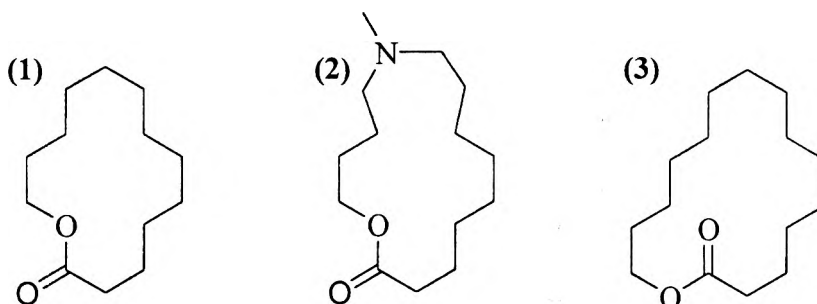
В доступной учебной литературе по фармацевтической химии группа антибиотиков-макролидов ограничивается «классическими» её представителями - эритромицином и олеандомицином. В учебной и научной литературе по фармакологии практически не рассматриваются химические свойства соединений данной группы. Цель настоящей лекции – дать общую характеристику антибиотиков-макролидов, описать их свойства и современные способы фармакопейного анализа.

2. Общая характеристика и классификация

Макролидами называют антибиотики, в молекулах которых содержится лактонное кольцо, состоящее из 14 - 16 атомов. В настоящее время группа макролидов насчитывает более десяти различных антибиотиков.

В зависимости от числа атомов, входящих в состав лактонного кольца, различают 14-, 15- и 16-членные макролиды. Известны антибиотики-макролиды с 12- и 17-членными кольцами, которые пока практического значения не имеют.

К 14-членным макролидам (1) относятся эритромицин, олеандомицин, кларитромицин, рокситромицин, диритромицин; 16-членным (3) - мидекамицин, джозамицин, розарамицин, рокитамицин, китазамицин, мирозамицин, спирамицин, тилозин (последний применяется, в основном, в ветеринарии). У 15-членных макролидов (2) в состав лактонного кольца входит атом азота, поэтому данные антибиотики называют **азалидами**. Примером азалида может служить азитромицин.



В зависимости от происхождения различают природные макролиды, макролиды-пролекарства (эфиры, соли и соли эфиров природных макролидов) и полусинтетические макролиды.

К природным макролидам относятся эритромицин, олеандомицин, спирамицин, мидекамицин, джозамицин и др. Продуцентами данных веществ являются различные микроорганизмы рода *Streptomyces*. Большинство природных макролидов представляют собой смеси веществ.

К макролидам-пролекарствам относят соли, сложные эфиры и соли эфиров природных макролидов. Например, одной из солей эритромицина, используемой в качестве лекарственного средства, является эритромицина стеарат. Примером эфира может служить эритромицина этилсукцинат, а солью эфира – эритромицина эстолат.

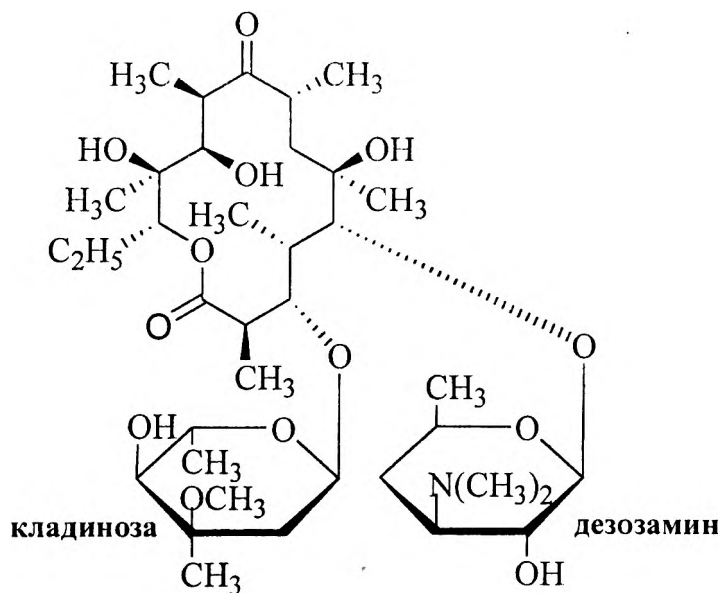
Полусинтетическими макролидами являются азитромицин, кларитромицин, рокситромицин, диритромицин и др.

В Республике Беларусь разрешены к медицинскому применению в качестве лекарственных средств эритромицин, его полусинтетические производные (азитромицин, кларитромицин, рокситромицин), а также олеандомицин, мидекамицин (макропен) и спирамицин (ровамицин).

3. Химическое строение

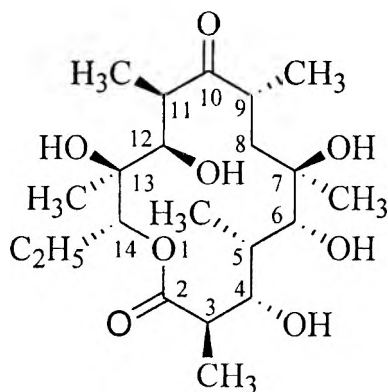
Антибиотики-макролиды являются гликозидами, основу структуры агликонов которых составляет макроциклическое лактонное кольцо. Наиболее важными макролидами являются эритромицин и его полусинтетические производные.

Эритромицин представляет собой смесь антибиотиков (эритромицины А, В, С, D, Е, F). Основным компонент данной смеси – эритромицин А, формула которого приведена ниже.



Агликон эритромицина, эритронолид, представляет собой полигидроксилактон, содержащий в лактонном цикле 14 атомов. К агликону β-гликозидными связями присоединены остатки двух аминосахаров – кладинозы и дезоамина.

Современные названия агликонов эритромицина и других макролидов основаны на использовании α-номенклатуры. В качестве родоначальной структуры для эритронолида взят циклотетрадекан. При замещении одного атома углерода в молекуле данного углеводорода на атом кислорода образуется оксациклотетрадекан. Нумерация атомов в образующемся соединении начинается с атома кислорода. Таким образом, согласно α-номенклатуре эритронолид имеет название (3R, 4S, 5S, 6R, 7R, 9R, 11R, 12R, 13S, 14R)- 4, 6, 7, 12, 13-гексагидрокси-3, 5, 7, 9, 11, 13-гексаметил-14-этилоксациклотетрадекандион-2, 10.



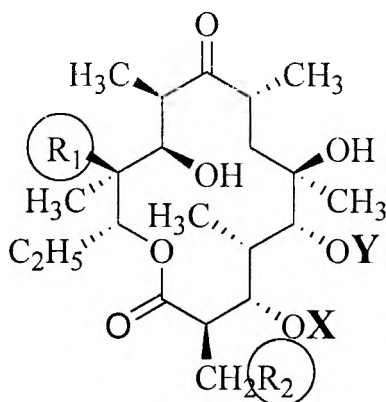
Существует и другой подход к нумерации атомов в лактонных циклах агликонов макролидов, при котором первый номер получает не атом кислорода, а атом углерода, связанный с ним.

Другие эритромицины отличаются от эритромицина А одним из моносахаридных остатков, а также радикалами, связанными с макроциклическим лактонным кольцом (табл. 1).

Таблица 1

Химическая структура эритромицинов

Эритромицин	R ₁	R ₂
В	-H	-H
С	-OH	-H
Д	-H	-H
Е	-OH	-O-
F	-OH	-OH



Углеводом Y, связанным с 6-м атомом углерода в лактонном цикле, у всех эритромицинов является дезоамин. Углевод X у эритромицинов В, Е и F – кладиноза, у эритромицинов С и D – микароза, отличающаяся от кладинозы наличием гидроксильной группы вместо метоксильной.

Согласно ВР 2001 суммарное содержание эритромицинов А, В и С в образце эритромицина должно быть не менее 93,0% и не более 100,5%. Согласно USP 24 нижняя граница суммарного содержания данных эритромицинов составляет 85,0%.

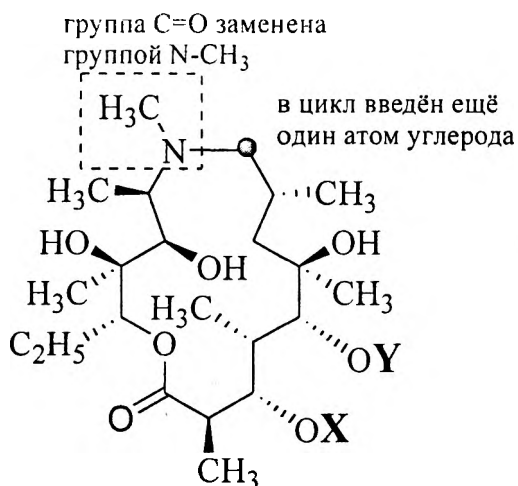
Эритромицин А служит исходным веществом для получения многих полусинтетических эритромицинов. Кларитромицин является простым эфиром эритромицина.



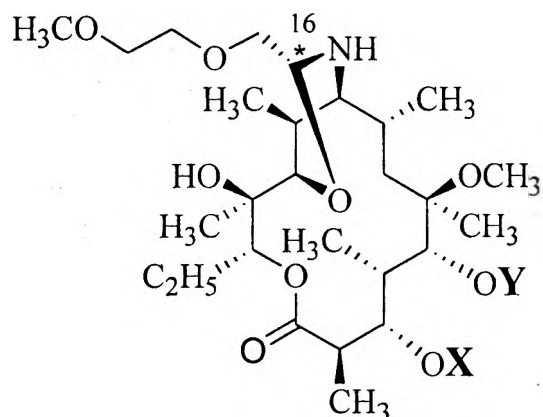
У рокситромицина карбонильная группа в 10-м положении лактонного цикла заменена оксимной.



У азитромицина эта же карбонильная группа заменена группой N-CH₃ (атом азота находится в цикле) и в макроцикл введён дополнительный атом углерода. Таким образом, азитромицин, имеет в своём составе 15-членный лактонный цикл и относится к азилидам.



Диритромицин является оксациновым производным эритромицина. Данный антибиотик представляет собой смесь двух эпимеров: 16R и 16S, причём содержание второго эпимера не должно превышать 1,5%.



4. Физико-химические и химико-аналитические свойства

Эритромицин представляет собой белый или слегка желтоватый порошок либо бесцветные или слегка желтоватые кристаллы, немного гигроскопичен. Мало растворим в воде (растворимость увеличивается при повышении температуры), легко растворим в этаноле, растворим в метаноле и в разбавленной хлороводородной кислоте.

Полусинтетические макролиды являются веществами белого цвета. Они мало растворимы или практически нерастворимы в воде и растворимы или легко растворимы в органических растворителях (ацетоне, этаноле и т.д.).

Молекулы антибиотиков-макролидов оптически активны. Величины удельного вращения данных веществ приведены в табл. 2.

Таблица 2

Величины удельного вращения антибиотиков-макролидов

Вещество	Концентрация	Удельное вращение
эритромицин	20 г/л (безводный этанол)	от -71° до -78°
кларитромицин	10 г/л (хлороформ)	от -89° до -95°
рокситромицин	10 г/л (ацетон)	от -93° до -96°
азитромицин	20 г/л (безводный этанол)	от -45° до -49°

Разные эритромицины, несмотря на незначительное различие в химической структуре, имеют неодинаковые величины удельного вращения. Например, для эритромицина А его величина составляет $-72,3 \pm 2,1^{\circ}$, а для эритромицина С – $-66,7 \pm 2,8^{\circ}$.

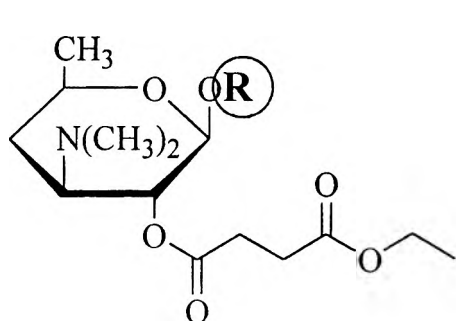
Антибиотики-макролиды практически не поглощают электромагнитное излучение ближнего УФ-диапазона, поэтому не могут быть определены методом прямой УФ-спектрофотометрии. Фотометрическое детектирование в ВЭЖХ для данных веществ проводится при длинах волн, близких к 200 нм (обычно 205 – 215 нм).

Химические свойства эритромицина и его производных обусловлены третичной аминогруппой в остатке дезозамина (основные свойства); гидроксильными группами в аглико-не и углеводных остатках (образование сложных эфиров, кеталей и полукеталей, реакции дегидратации); карбонильной группой (образование полукеталей и кеталей) и лактамной группой (гидролиз).

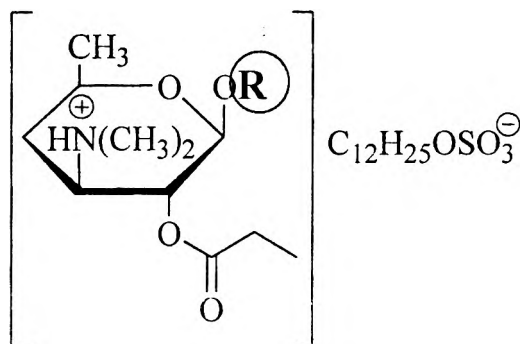
Антибиотики-макролиды обладают достаточно выраженными основными свойствами. Например, величина pK_{BH^+} эритромицина равна 8,8. Эритромицин и другие макролиды образуют соли с анионами различных кислот, взаимодействуют с анионными реагентами (об-

шеалкалоидными реактивами, тетрафенилборатом натрия, анионными красителями и т.д.). Соли эритромицина с некоторыми кислотами используются в качестве лекарственных средств. Например, эритромицина стеарат более устойчив в кислой среде и обладает большей биодоступностью, чем эритромицин. Реакции с анионными реагентами, приводящие к образованию малорастворимых соединений, используются для идентификации эритромицина и других антибиотиков данной группы. Так, тетрафенилборат эритромицина практически нерастворим в воде и имеет температуру плавления 183 – 186 °С. Реакции с анионными органическими красителями используются при экстракционно-фотометрическом (сульфоталеины) и экстракционно-флуориметрическом (галогенпроизводные флуоресцеина) определении антибиотиков-макролидов.

Эритромицин и другие макролиды могут образовывать сложные эфиры с различными кислотами. Обычно в образовании эфиров принимает участие гидроксильная группа, находящаяся в остатке дезоамина. Некоторые из эфиров (либо солей эфиров) используются в качестве лекарственных средств.

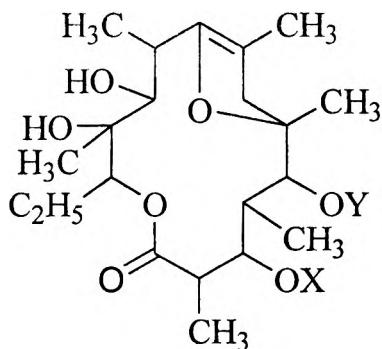


Эритромицин этилсукцинат

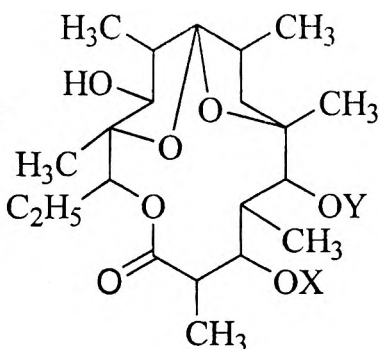


Эритромицин эстолат

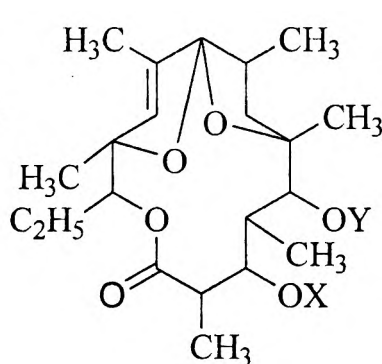
В водных растворах в кислой и щелочной среде антибиотики-макролиды подвергаются различным химическим превращениям: гидролизу, образованию полукеталей и кеталей, дегидратации и др. Например, эритромицин образует в кислой среде следующие продукты:



Эритромицин енол эфир



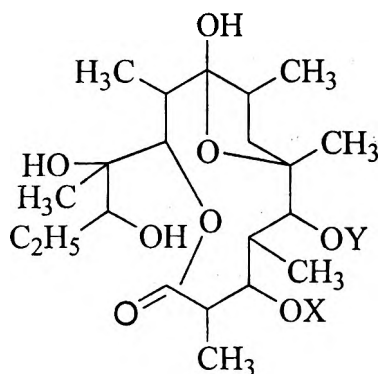
Ангидроэритромицин



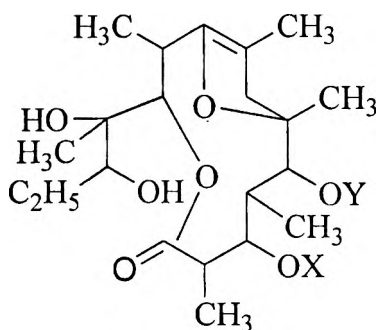
Эритролозамин

При взаимодействии с концентрированными кислотами эритромицин образует окрашенные продукты. Например, при взаимодействии с концентрированной серной кислотой появляется красновато-коричневое окрашивание. При взаимодействии эритромицина с хлороводородной кислотой раствор окрашивается в жёлтый цвет. Добавление концентрированной хлороводородной кислоты к ацетоновому раствору эритромицина приводит к появлению оранжевого окрашивания, переходящего в красное, а затем в интенсивно фиолетово-красное. Данные реагенты используют для идентификации эритромицина.

Одним из продуктов превращения эритромицина в щелочной среде является псевдоэритромицин:



Псевдоэритромицин А
полукеталь



Псевдоэритромицин А
енол эфир

5. Контроль качества

5.1. Идентификация

Для идентификации эритромицина используют химические реакции (например с HCl или H₂SO₄), ТСХ и ИК-спектроскопию.

Идентификацию эритромицина методом ТСХ проводят, как правило, на силикагеле. Подвижная фаза представляет собой смесь неполярного растворителя (толуола, этилацетата) с полярным растворителем, например изопропиловым спиртом. Для получения основания эритромицина в подвижную фазу добавляют концентрированный раствор аммиака либо аммиачный буфер. Проявление хроматограмм проводят с помощью реактива, содержащего 4-метоксибензальдегид (анисовый альдегид), этанол и серную кислоту.

Для идентификации полусинтетических макролидов, как правило, применяют ИК-спектроскопию и ВЭЖХ.

5.2. Испытания на чистоту

При контроле чистоты лекарственных препаратов эритромицина и других макролидов определяют удельное вращение и pH растворов, содержание воды, сульфатной зольности и др. Эритромицин, как показано выше, представляет собой смесь нескольких антибиотиков. Для определения их содержания обычно используют ВЭЖХ или ТСХ.

5.3. Количественное определение

Количественное определение антибиотиков-макролидов, согласно современной нормативной документации проводят, главным образом, методом ВЭЖХ. Хроматографическое разделение эритромицинов обычно проводят в щелочной среде. Химически модифицированные силикагели в щелочной среде неустойчивы, поэтому в качестве неподвижной фазы при ВЭЖХ-определении эритромицина применяют сополимеры стирола и дивинилбензола. Например, согласно USP 24 и ВР 2001, при определении эритромицина методом ВЭЖХ в качестве неподвижной фазы используют сополимер стирола и дивинилбензола с размером пор 100 нм; подвижная фаза смесь фосфатного буферного раствора (pH 9,0), *трет*-бутилового спирта и ацетонитрила; детектирование - спектрофотометрическое (215 нм).

Количественное определение полусинтетических макролидов (кларитромицина, рокситромицина, диэритромицина) методом ВЭЖХ проводят в слабокислой или нейтральной среде на C₁₈-силикагелях. В качестве подвижных фаз используют смеси фосфатного буферного раствора с ацетонитрилом и (или) метанолом. Детектирование - спектрофотометрическое (205 – 210 нм). ВЭЖХ-определение азитромицина, согласно USP 24, проводят в сильнощелочной среде. Подвижной фазой является смесь фосфатного буферного раствора (pH 11) и ацетонитрила. В качестве неподвижной фазы используется полимер бутадиена, содержащий оксид алюминия (такой сорбент применяется в USP только для азитромицина); детектирование – амперометрическое.

Для количественного определения антибиотиков-макролидов используют также микробиологический метод анализа; фотометрию, основанную на реакциях образования окрашенных соединений, полярографию и т.д.

6. Фармакокинетика и метаболизм

Антибиотики-макролиды обладают бактериостатическим действием. Механизм их действия связан с блокадой 50S субъединицы рибосом и подавлением РНК-зависимого синтеза белка в микробной клетке.

Эритромицин и другие макролиды хорошо всасываются в ЖКТ, поэтому применяются, главным образом, перорально. В желудке эритромицин частично разрушается. Полусинтетические макролиды (особенно кларитромицин), эфиры и некоторые соли эритромицина более стабильны в кислой среде желудка. Максимальная концентрация в плазме крови достигается через несколько часов после приёма.

В крови макролиды в значительной степени связываются с белками. Наибольшая степень связывания (92-96%) характерна для рокситромицина, у эритромицина она составляет 74%, у азитромицина – 23 – 50%.

Макролиды хорошо проникают в различные органы и ткани (например, для азитромицина величина кажущегося объёма распределения равна 31 л/кг). Из-за хорошего проникновения внутрь клеток макролиды используются для лечения заболеваний, вызываемых внутриклеточными паразитами (микоплазмы, хламидии и т.д.). Макролиды способны создавать очень высокие и длительно сохраняющиеся тканевые концентрации, превышающие концентрации в сыворотке крови (эритромицин – в 5-10 раз, азитромицин – в 10-100 раз). Лишь рокситромицин создает менее высокие концентрации в тканях, чем в крови, что, по-видимому, обусловлено высокой степенью его связывания с белками плазмы.

Антибиотики группы макролидов подвергаются метаболизму в печени. Большинство метаболитов фармакологически неактивно. Неизмененные антибиотики-макролиды и их метаболиты выводятся из организма, главным образом, с желчью и в значительно меньших количествах с мочой. Период полувыведения эритромицина составляет 1-2 часа, у полусинтетических макролидов он значительно больше (например, у азитромицина – 68 часов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств. Государственный реестр медицинской техники и изделий медицинского назначения / Мин-во здравоохранения Республики Беларусь. Под ред. Г.В. Годовальникова. – Мн.: Минсктиппроект. – 2003.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1986.
3. Макролиды / Под ред. А.М. Попковой, А.Л. Вёрткина, С.В. Колобова. – М.: Диалог-МГУ, 2000.
4. Международная фармакопeia. 3-е изд. – Женева: Всемирная организация здравоохранения. – 1990. – Т. 3.
5. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Макролиды в современной клинической практике. – Смоленск: Русич, 1998.
6. Энциклопедия лекарств // www.rlsnet.ru.
7. The British Pharmacopoeia 2001.
8. The United States Pharmacopeia, Twenty-Fourth Revision.
9. Kanfer I., Skinner M.F., Walker R.B. Analysis of macrolide antibiotics // J. Chromatogr. – 1998. – Vol. 812. – P. 255 – 286.
10. Marzo A., Dal Bo L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic application // J. Chromatogr. 1998. Vol. 812. P. 17 – 34.

SUMMARY

General characteristic of macrolide antibiotics, chemical structure and properties of erythromycin and their semisynthetic derivatives are given in the lecture. The current data about pharmacopoeial analysis of the macrolides are presented.